 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.12.03 J South Med Univ, 2015, 35(12): 1678-1682

基础研究

丙泊酚保护脑缺血再灌注损伤可能与缝隙连接功能的抑制相关

樊宗兵，童旭辉，李 言，于 丽，陈银玲，刘浩昂，董淑英
蚌埠医学院药学系药理学教研室，安徽 蚌埠 233030

摘要：目的 探讨丙泊酚对脑缺血再灌注损伤的保护作用与缝隙连接的关系及其可能机制。**方法** 70只雄性SD大鼠随机分为假手术(sham)组、缺血再灌注(I/R)组、丙泊酚低剂量(P_{25}，25 mg/kg)组、中剂量(P_{50}，50 mg/kg)组、高剂量(P_{100}，100 mg/kg)组、甘珀酸(CBX)干预缺血再灌注(I/R+CBX)组和甘珀酸干预丙泊酚高剂量(P_{100}+CBX)组。采用线栓法制备大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型，脑缺血2 h，再灌注24 h；采用Longa's法对大鼠进行神经行为学评分；TTC染色法检测脑梗死体积的变化；Western blot法检测缝隙连接蛋白43(Cx43)、蛋白激酶C(PKC)以及凋亡相关因子Bax、Bcl-2的蛋白表达变化。**结果** 与缺血再灌注组相比，除丙泊酚低剂量组外，丙泊酚中、高剂量组神经功能缺损评分和脑梗死体积百分率均明显降低，且高剂量组效果更佳；甘珀酸可以进一步增强丙泊酚对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用。Western blot结果显示，与sham组相比，I/R组Cx43蛋白表达以及Bax与Bcl-2比值显著增高，而PKC蛋白表达明显降低；丙泊酚高剂量组较I/R组Cx43蛋白表达及Bax与Bcl-2比值明显降低，PKC蛋白表达显著增多；且甘珀酸可以使丙泊酚的这一作用增强。**结论** 丙泊酚预处理可减轻I/R损伤，其机制可能与通过PKC信号通路抑制缝隙连接功能及降低Bax/Bcl-2的比值有关。

关键词：脑缺血再灌注损伤；丙泊酚；蛋白激酶C；缝隙连接蛋白43；缝隙连接；凋亡

Protective effect of propofol against cerebral ischemic/reperfusion injury may involve inhibition of gap junction

FAN Zongbing, TONG Xuhui, LI Yan, YU Li, CHEN Yinling, LIU Haoang, DONG Shuying
Department of Pathology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of propofol against focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats and its relation with gap junction. **Methods** Seventy adult male SD rats were randomly divided into sham-operated group, I/R group, low-, moderate-, and high-dose propofol groups (25, 50, 100 mg/kg; P_{25}, P_{50}, P_{100} groups, respectively), I/R+CBX group and P_{100}+CBX group. Thread occlusion was used to induce middle cerebral artery occlusion (MCAO) in the mice for 2 h followed by reperfusion for 24 h. Longa's scores were used to evaluate the neurological behavior of the rats. TTC staining was used to measure the cerebral infarction volume and Western blotting was performed to detect the expressions of Cx43, PKC, Bax, and Bcl-2 in the brain of the rats. **Results** Compared with the I/R group, the rats pretreated with moderate and high doses of propofol showed significantly reduced neurological behavior scores and cerebral infarction volume percentage, and the effect was more obvious in high-dose propofol pretreatment group. CBX obviously enhanced the protective effect of propofol against I/R injury. Compared with those in the sham-operated group, the protein expression of Cx43 and the Bax/Bcl-2 ratio were increased and the protein expression of PKC was reduced in I/R group, and these changes were significantly reversed by high-dose propofol pretreatment; the effects of propofol were further enhanced by CBX. **Conclusion** The protective effect of propofol against cerebral I/R injury may involve the inhibition of the gap junction via PKC signaling and by reducing the Bax/Bcl-2 ratio.

Key words: cerebral ischemia reperfusion injury; propofol; PKC; Cx43; gap junction; apoptosis

缺血性脑卒中是脑卒中的主要形式[1]，具有高致残率和高致死率的特点，严重威胁着人类的健康，且围手术期患者的脑缺血再灌注(I/R)损伤十分常见。丙泊酚作为一种临床常用的麻醉药近年来被证实对肾脏、肝脏、心脏的缺血性损伤都有一定的保护作用[2-3]。研究发现，丙泊酚预处理能够减轻脑缺血再灌注损伤，但作用机制并不完全清楚，仍有待进一步深入探讨[4]。缝隙连接(GJ)是细胞中广泛存在的一种特殊连接通道，在脑组织中以缝隙连接蛋白43(Cx43)组成的缝隙连接最为多见[5]，研究表明，抑制缝隙连接(GJ)功能可以减轻脑缺血再灌注损伤[6]，且有研究发现，丙泊酚可通过抑制缝隙连接功能降低原位肝移植导致的急性肾损伤[7]。但丙泊酚对脑缺血再灌注损伤的保护作用是否与抑制GJ功能有关，尚不明确。B细胞淋巴瘤-2基因(Bcl-2)家族的Bcl-2、Bax基因组成一个平衡体系，共同参与脑缺血再

收稿日期：2015-09-11
基金项目：国家自然科学基金(81402930，81202833)；安徽省自然科学基金(1408085MH176)；蚌埠医学院研究生科研创新计划项目(Byycx1434，，Byycx1552)；安徽省大学生创新项目(AH201410367047)
Supported by National Natural Science Foundation of China (81402930, 81202833).
作者简介：樊宗兵，硕士，E-mail: 15215520282@126.com
通信作者：董淑英，博士，教授，E-mail: bbmcdsy@126.com

灌注损伤的细胞凋亡过程,有文献报道丙泊酚可降低缺血再灌注脑损伤大鼠海马区凋亡因子Bax的表达,提高抑制凋亡因子Bcl-2的表达,对缺血再灌注脑损伤有一定保护作用[8];研究发现,调控缝隙连接功能可以通过影响Bax、Bcl-2的蛋白表达从而对肿瘤细胞的凋亡产生影响[9]。但丙泊酚影响Bax、Bcl-2的蛋白表达是否与其抑制缝隙连接功能有关,尚未见报道。本实验中采用缝隙连接抑制剂甘珀酸(CBX)作为研究整体动物缝隙连接功能的工具药,旨在研究GJ在丙泊酚对大鼠脑I/R损伤保护中的作用,并对其可能机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *实验动物* SPF级雄性SD大鼠70只,体质量300±20 g,由浙江省实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(浙)2014-0001。

1.1.2 *主要试剂* 丙泊酚购于四川国瑞药业有限公司(产品批号1403291);PKC单克隆抗体购于Abcam;Bax、Bcl-2单克隆抗体购于BOSTER;Cx43单克隆抗体、TTC(2, 3, 5, -氯三苯基四氮唑)、GAPDH单克隆抗体、山羊抗小鼠IgG二抗、山羊抗兔Ig G二抗均购于Sigma;其他试剂均为国产分析纯级。

1.2 实验方法

1.2.1 *实验分组* 将70只大鼠随机分为7组,每组10只:假手术(sham)组、缺血再灌注(I/R)组、丙泊酚低剂量(P_{25},25 mg/kg)组、中剂量(P_{50},50 mg/kg)组、高剂量(P_{100},100 mg/kg)组、甘珀酸(CBX)干预缺血再灌注(I/R+CBX)组和甘珀酸干预丙泊酚高剂量(P_{100}+CBX)组。

1.2.2 *大鼠脑缺血再灌注损伤模型制作* 参照Zea-land[10]法稍作改进制备大鼠局灶性I/R模型。使用直径为0.28~0.32 mm的线栓阻断大鼠大脑中动脉血流,造成大鼠局灶性脑缺血,缺血2 h后拔出线栓,恢复血流再灌注24 h,即I/R损伤模型。sham组只进行手术操作,但不插入线栓阻断大脑中动脉血流。相应剂量的丙泊酚(25、50、100 mg/kg)于脑缺血前10 min经腹腔注射给药;甘珀酸(0.2 mg/kg)于再灌注前1 min尾静脉注射给药。

1.2.3 *神经行为学评估* 按照文献报道的神经行为功能缺失的评分方法[11],对再灌注24 h后的大鼠神经功能行为进行评分(每组10只)。0分:无可见的明显神经功能缺失症状,活动正常;1分:不能完全伸展手术对侧前肢;2分:行走时向手术对侧转圈;3分:行走时向手术对侧倾倒,行动不便;4分:不能行走、意识水平下降或处于昏迷状态。其中神经行为评分≥1分为成功模型。

1.2.4 *脑梗死体积测定* 再灌注24 h后,立即断头取出脑组织(每组6只),置于−20 ℃冰箱冷冻12 min后自额极向后连续等距切取6张冠状脑片。1% TTC避光染色30 min(37 ℃),正常脑组织染为红色,脑梗死区域为白色。染色后将脑片置于4%多聚甲醛溶液中保存24 h,逐层拍照。采用Image J软件对脑片相应部位面积进行测量,使用公式:脑梗死体积百分率/%=100%×{对侧大脑皮质的面积-[同侧大脑皮质的面积-脑梗塞的面积]}/对侧大脑皮质的面积[12],计算脑梗死体积百分率。

1.2.5 *Western Blot检测相关蛋白表达变化* 大鼠再灌注24 h后,立即断头取脑(每组4只),夹取大鼠右侧缺血区脑组织,提取蛋白,进行标准蛋白定量;制备12% SDS-PAGE凝胶,取50 μg/孔蛋白样品进行上样、电泳(70 V, 400 mA, 30 min;95 V, 400 mA, 120 min);转膜(50 V, 250 mA, 150 min);洗膜、封闭2 h;洗膜、与Cx43(1∶2000)、PKC(1∶1000)、Bax(1∶2000)、Bcl-2(1∶1000)共同孵育,4 ℃恒温过夜;洗涤后于左右摇床上室温孵育二抗(山羊抗鼠抗体:1∶5000;山羊抗兔抗体:1∶5000)2 h。其中GAPDH(1∶2000)单克隆抗体室温孵育两小时即可。二抗孵育2 h后,采用ECL发光试剂盒发光、显影,使用凝胶图像分析系统采集图像,图像采集后使用Bio Imaging system(Gene Genius)对图像进行灰度扫描分析。

1.3 统计学分析

采用SPSS 17.0软件分析实验结果,数据资料以均数±标准差表示,计量资料比较进行单因素ANOVA分析,$P<0.05$认为有统计学意义,统计图采用Sigma Plot 10.0绘制。

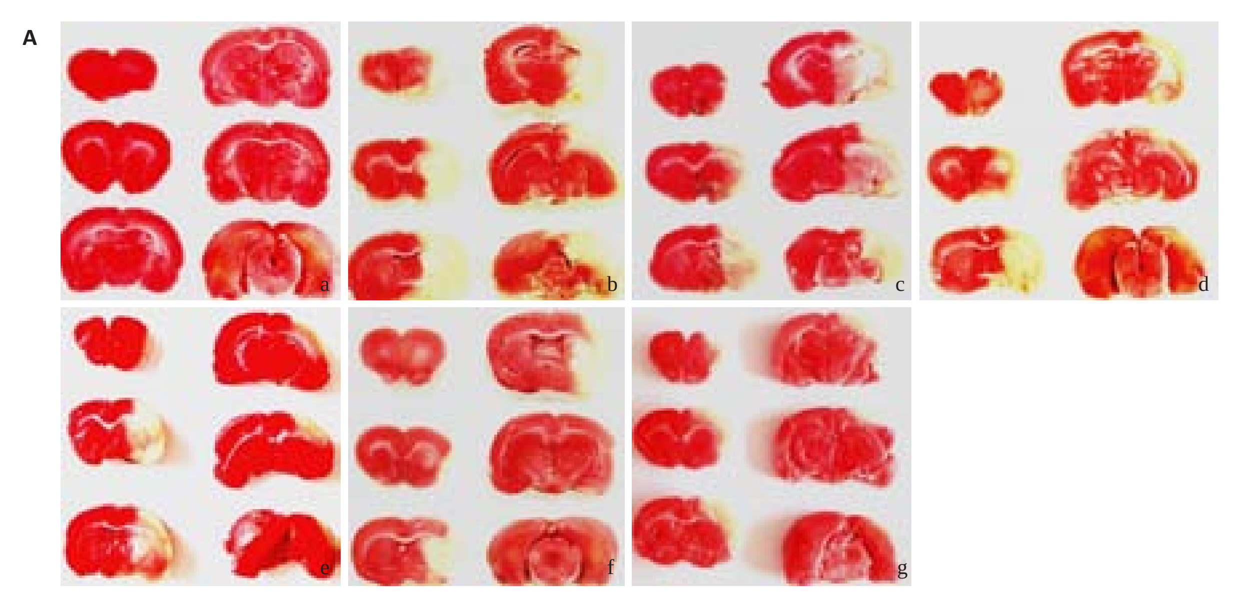
2 结果

2.1 丙泊酚对脑I/R损伤大鼠神经功能评分的影响

大鼠脑缺血2 h,再灌注24 h后,对大鼠进行神经行为学评分,其结果为:sham组大鼠无神经功能缺失症状,I/R组神经行为学评分为2.90±0.57,P_{25}组为2.80±0.42,P_{50}组为2.40±0.70,P_{100}组为2.80±0.42,I/R+CBX组为1.70±0.67,P_{100}+CBX组为1.30±0.48。以上神经行为学评分结果显示:与I/R组相比,丙泊酚中、高剂量组神经功能缺损评分均显著降低($P<0.05$),且高剂量组降低效果更明显,但低剂量组无显著性差异。与异丙酚高剂量组相比,甘珀酸干预丙泊酚高剂量组大鼠的神经行为学评分进一步降低($P<0.05$)。

2.2 丙泊酚对脑I/R损伤大鼠脑梗死体积的影响

大鼠脑组织TTC染色后,脑组织梗死区域呈白色,非梗死区域呈红色,结果显示:sham组无明显梗死灶外,其他各实验组均出现不同程度的梗死灶。丙泊酚中、高剂量组较I/R组脑梗死体积均显著缩小($P<0.05$),且高剂量组缩小效果更加显著($P<0.05$),但丙泊酚低剂量组无显著性差异;在丙泊酚高剂量的基础上,加用甘珀酸,大鼠脑梗死体积进一步缩小($P<0.05$,图1)。



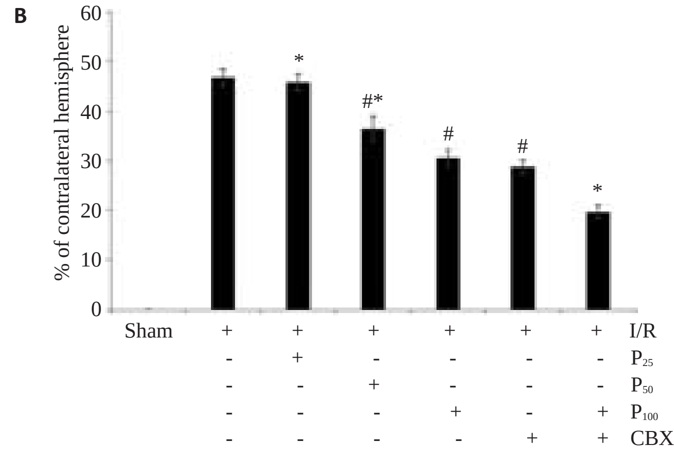


图1 丙泊酚对脑缺血再灌注损伤后大鼠的脑梗死体积的影响

Fig.1 Effect of propofol on brain infarct volume in rats with focal cerebral I/R injury detected by TTC staining. ***A***: Slices of brain tissue. a: Sham; b: I/R; c: P_{25}; d: P_{50}; e: P_{100}; f: I/R + CBX; g: P_{100} + CBX. ***B***: Quantitative analysis of brain infarct volume (*n*=6). Bars are standard deviation. #*P*<0.05 *vs* I/R group. **P*< 0.05 *vs* P_{100} group.

2.4 丙泊酚对脑I/R损伤大鼠脑组织中Cx43、PKC蛋白表达的影响

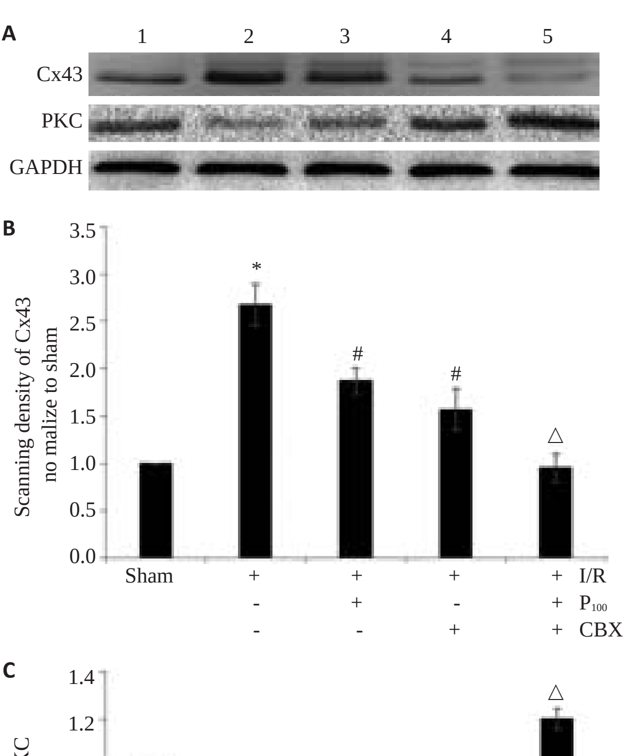
由神经行为学评分和TTC染色结果可知，丙泊酚高剂量对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用最佳，因此选用丙泊酚高剂量(100 mg/kg)用于后续机制研究的实验。采用Western blot检测Cx43、PKC蛋白表达变化。结果显示：与sham组相比，I/R组Cx43蛋白表达显著增高(*P*<0.05)；丙泊酚高剂量组较I/R组Cx43蛋白表达显著降低(*P*<0.05)；甘珀酸干预丙泊酚高剂量组较丙泊酚高剂量组Cx43蛋白表达进一步降低(*P*<0.05)。各组大鼠的PKC蛋白表达趋势与Cx43蛋白表达趋势相反(图2)。

2.5 丙泊酚对脑I/R损伤大鼠脑组织中Bax、Bcl-2蛋白表达的影响

采用Western blot检测 Bax、Bcl-2的蛋白表达变化，结果显示：I/R组Bax/Bcl-2的比值较sham组明显增加(*P*<0.05)；丙泊酚高剂量预处理后可显著降低脑缺血再灌注损伤Bax/Bcl-2的比值(*P*<0.05)；且CBX可使丙泊酚高剂量组Bax/Bcl-2的比值进一步降低(*P*<0.05，图3)。

3 讨论

丙泊酚作为一种静脉麻醉药，具有类维生素E的结构，有抗脂质过氧化的作用；其药代动力学特征为起效快、停药恢复快，因此广泛应用于临床麻醉的诱导和维持。近年来，多个研究[13-15]表明丙泊酚可以减轻大鼠脑缺血再灌注损伤，但其作用机制尚不完全清楚。本实验通过神经行为学评分和TTC染色结果证实丙泊酚对I/R损伤有一定的保护作用，且高剂量效果较佳，与其他研究者的发现[16]保持一致，因此本实验选用保护作用效果较佳的高剂量丙泊酚(100 mg/kg)进行后续的机制研究。研究发现，脑缺血再灌注过程中GJ功能有明显的增强，抑制GJ功能脑I/R损伤显著降低[7]。CBX具有抑制GJ的功能，且起效快、能通过血脑屏障，可以用于对整体动物缝隙连接功能的研究。从本实验神经功能评分、TTC染色结果可以看出，丙泊酚和CBX都可以降低I/R 损伤，且CBX可使丙泊酚的保护作用增强。Western blot结果显示，I/R组Cx43蛋白表达较sham组明显增加，丙泊酚可显著降低Cx43蛋白表达，且CBX可使丙泊酚组Cx43蛋白表达进一步降低。说明丙泊酚



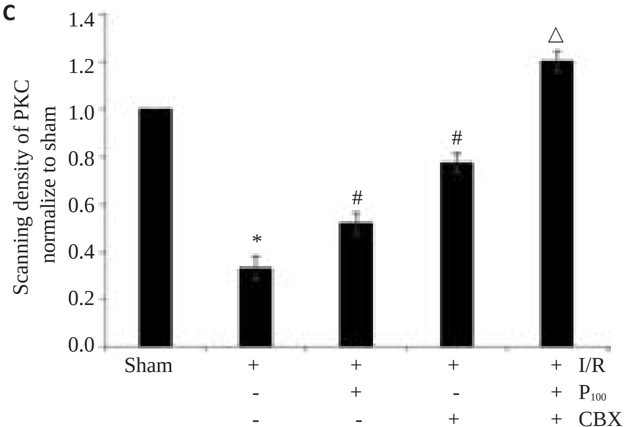


图2 丙泊酚对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中Cx43和PKC蛋白表达的影响

Fig.2 Effect of propofol on the expression of Cx43 and PKC in rats with cerebral I/R injury detected by Western blotting. *A*: Expression of Cx43 and PKC. 1: sham; 2: I/R; 3: P_{100}; 4: I/R+CBX; 5: P_{100}+CBX; *B*: Quantitative analysis of Cx43; *C*: Quantitative analysis of PKC (n=4); Bars indicate standard deviation. *P<0.05 *vs* sham group. $^{\#}P$<0.05 *vs* I/R group. $^{\triangle}P$<0.05 *vs* P_{100} group.

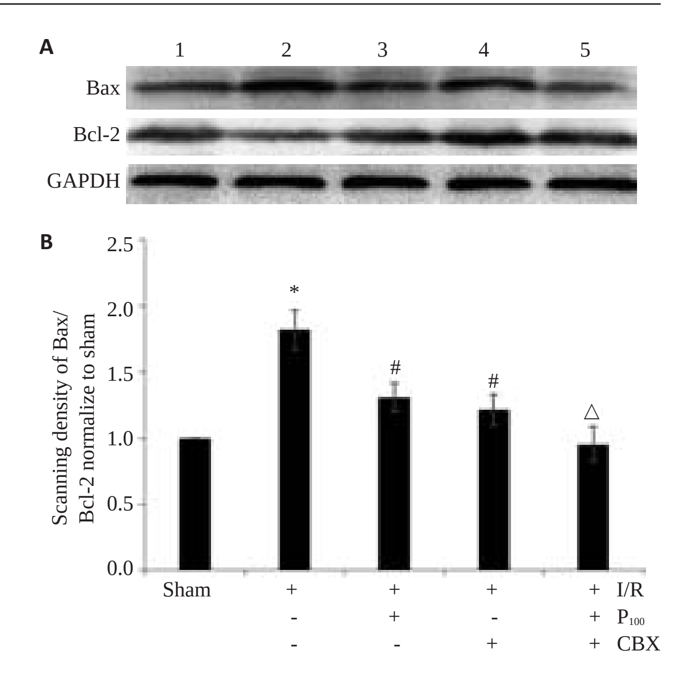


图3 丙泊酚对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中Bax和Bcl-2蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of propofol on the expression of Bax and Bcl-2 in rats with cerebral I/R injury detected by Western blotting. *A*: Expression of Bax and Bcl-2. 1: sham; 2: I/R; 3: P_{100}; 4: I/R+CBX; 5: P_{100}+CBX. *B*: Quantitative analysis of the Bax/Bcl-2 (n=4); Bars indicate standard deviation. *P<0.05 *vs* sham group. $^{\#}P$<0.05 *vs* I/R group. $^{\triangle}P$<0.05 *vs* P_{100} group.

的保护作用与抑制缝隙连接功能有关。

缝隙连接(GJ)通道是由两个缝隙连接半通道对接而成,而每个缝隙连接半通道是由六个缝隙连接蛋白(Cx)组成的六聚体构成。有文献报道,GJ在同步细胞的活动、维持细胞内环境稳定、控制细胞的生长和发育等生命过程中发挥十分重要的作用[17]。脑组织中分布最为广泛的是Cx43蛋白[18],因此本实验以Cx43为研究缝隙连接功能的主要对象。近年来,有研究发现,Cx43蛋白可以作为治疗缺血再灌注损伤的新靶点[19],其作用日益受到研究者们的关注。本实验中,I/R组Cx43蛋白表达高于sham组;P_{100}组Cx43蛋白表达低于I/R组;P_{100}+CBX组Cx43蛋白表达低于I/R+P3组。说明抑制Cx43蛋白表达可以降低脑I/R损伤,且丙泊酚可以通过抑制Cx43的蛋白表达从而减轻I/R损伤;CBX可以使P_{100}组的Cx43蛋白表达进一步降低,I/R损伤得以进一步减轻。

PKC激酶属于多功能丝氨酸/苏氨酸激酶,广泛调节各个细胞的生理功能,参与缺血再灌注损伤等疾病的发生、发展过程[20]。PKC可以磷酸化Cx43蛋白的特殊位点,从而降低GJ功能[21]。因此本实验观察了丙泊酚处理后PKC与Cx43蛋白之间的关系,结果显示,与sham组相比,I/R组中PKC蛋白显著降低,P3组的PKC蛋白的表达高于I/R组,CBX可以使P_{100}组的PKC蛋白表达进一步增高,说明PKC蛋白可能参与了丙泊酚抑制缝隙连接功能从而降低I/R损伤的过程。B细胞淋巴瘤-2基因(Bcl-2)家族的Bcl-2、Bax基因组成一个平衡体系,共同参与脑I/R损伤过程中由于活性氧过度释放引起的细胞凋亡[22]。其中抗凋亡基因Bcl-2与抑制细胞凋亡、延长细胞生存有关;而促凋亡基因Bax表达增高时可促进细胞凋亡。因此,研究者采用Bax/Bcl-2的比值作为评价细胞凋亡的一个重要标志[23]。Western blot结果显示,I/R组Bax/Bcl-2的比值较sham组明显增加,丙泊酚预处理可显著降低脑缺血再灌注损伤Bax/Bcl-2的比值,且CBX可使丙泊酚组Bax/Bcl-2的比值进一步降低。

综上所述,丙泊酚预处理可减轻I/R损伤,其机制可能与通过影响PKC蛋白表达从而抑制缝隙连接功能及降低Bax/Bcl-2的比值有关。

参考文献:

[1] Eshah NF. Lifestyle and health promoting behaviours in Jordanian subjects without prior history of coronary heart disease[J]. Int J Nurs Pract, 2011, 17(1): 27-35.

[2] Yang S, Chou WP, Pei L. Effects of propofol on renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Exp Ther Med, 2013, 6(5): 1177-83.

[3] Ye L, Luo CZ, Mccluskey SA, et al. Propofol attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in an in vivo rabbit model[J]. J Surg Res, 2012, 178(2): e65-70.

[4] Zhou R, Yang Z, Tang X, et al. Propofol protects against focal cerebral ischemia via inhibition of microglia-mediated proinflammatory cytokines in a rat model of experimental stroke[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82729.

[5] Homkajorn B, Sims NR, Muyderman H. Connexin 43 regulates astrocytic migration and proliferation in response to injury[J]. Neurosci Lett, 2010, 486(3): 197-201.

[6] Wang N, De Vuyst E, Ponsaerts R, et al. Selective inhibition of Cx43 hemichannels by Gap19 and its impact on myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Basic Res Cardiol, 2013, 108(1): 309.

[7] Luo C, Yuan D, Li X, et al. Propofol attenuated acute kidney injury after orthotopic liver transplantation via inhibiting gap junction composed of connexin 32[J]. Anesthesiology, 2015, 122(1): 72-86.

[8] 肖 峰, 周晓清, 李元涛, 等. 异丙酚对大鼠缺血再灌注海马区Bax和Bcl-2表达的影响[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2010, 39(1): 113-5, 119.

[9] Tong X, Han X, Yu B, et al. Role of gap junction intercellular communication in testicular leydig cell apoptosis induced by oxaliplatin via the mitochondrial pathway[J]. Oncol Rep, 2015, 33(1): 207-14.

[10] Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric Oxygen in a rat focal cerebral ischemic model[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2003, 23(7): 855-64.

[11] Ye XH, Wu Y, Guo PP, et al. Lipoxin a4 analogue protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia reperfusion[J]. Brain Res, 2010, 1323(15): 174-83.

[12] Zhang YM, Xu H, Sun H, et al. Electroacupuncture treatment improves neurological function associated with regulation of tight junction proteins in rats with cerebral ischemia reperfusion injury[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 15(6): 989340.

[13] Ji FT, Liang JJ, Miao LP, et al. Propofol postconditioning protects the blood brain barrier by decreasing matrix metalloproteinase9 and aquaporin4 expression and improves the neurobehavioral outcome in a rat model of focal cerebral ischemiareperfusion injury[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 2049-55.

[14] Wang H, Liu S, Wang H, et al. The effect of propofol postconditioning on the expression of K(+)-Cl(-)-co-transporter 2 in GABAergic inhibitory interneurons of acute ischemia/reperfusion injury rats[J]. Brain Res, 2015, 1597(16): 210-9.

[15] Yue ZY, Dong H, Wang YF, et al. Propofol prevents neuronal mtDNA deletion and cerebral damage due to ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Brain Res, 2015, 1594(8): 108-14.

[16] 宋春雨, 陶 涛, 崔晓光, 等. 丙泊酚对全脑缺血/再灌注损伤大鼠保护作用研究[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2011, 32(4): 393-7.

[17] Giaume C, Orellana JA, Abudara V, et al. Connexin-based channels in astrocytes: how to study their properties[J]. Methods Mol Biol, 2012, 814: 283-303.

[18] 董淑英, 童旭辉, 蒋国君, 等. 星形胶质细胞中缝隙连接蛋白connexin 43的表达及其功能调控[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(10): 1423-6.

[19] Schulz R, Görge PM, Görbe A, et al. Connexin 43 is an emerging therapeutic target in ischemia/reperfusion injury, cardioprotection and neuroprotection[J]. Pharmacol Ther, 2015, 153(7): 90-106.

[20] 张凤云, 赵 炎, 吴玉林. 蛋白激酶C在脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(4): 461-8.

[21] Shan H, Wei J, Zhang M, et al. Suppression of PKCε-mediated mitochondrial connexin 43 phosphorylation at serine 368 is involved in myocardial mitochondrial dysfunction in a rat model of dilated cardiomyopathy[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(6): 4720-6.

[22] Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive Oxygen species Generation[J]. Mol Neurobiol, 2013, 47(1): 9-23.

[23] Huang X, Choi JK, Park SR, et al. GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins[J]. Neurosci Res, 2007, 58(1): 50-7.

(编辑:孙昌朋)